



Universiteit
Leiden
The Netherlands

New developments in analysis of ocular surface diseases|Nieuwe ontwikkelingen in analyse van ziekten van het oogoppervlak

Keijser, S.

Citation

Keijser, S. (2008, June 18). *New developments in analysis of ocular surface diseases|Nieuwe ontwikkelingen in analyse van ziekten van het oogoppervlak*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12959>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12959>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

SAMENVATTING

Veel oogziekten van het voorsegment kunnen leiden tot een visuele handicap of zelfs tot blindheid. Een normale anatomie en fysiologie van het oogoppervlak en het voorsegment is een vereiste voor een goede gezichtsscherpte. In dit proefschrift onderzoeken we verschillende voorsegmentziekten welke de normale anatomie van het oogoppervlak kunnen verstoren. Tevens onderzoeken we nieuwe analysemogelijkheden van deze ziekten. De limbus speelt een centrale rol in het onderhouden van een normaal oogoppervlak, het is de plaats waar de cornea-epitheelstamcellen zich bevinden en het cornea-epitheel zich vernieuwt. Het onderwerp van Deel I van dit proefschrift is limbusstamceldeficiëntie, waar nieuwe mogelijkheden in het limbusonderzoek worden geëxploreerd. Herhaaldelijke chirurgie in de limbusregio is een oorzaak van limbusstamceldeficiëntie, hetgeen vaak wordt gezien bij melanocyttaire laesies van de conjunctiva. Conjunctivamelanoom en benigne melanocyttaire laesies zoals primary acquired melanosis (PAM) en conjunctivanaevi zijn het onderwerp van Deel II. Daar focussen we op detectie en differentiatie methoden voor conjunctivamelanomen. In het bijzonder richt onze aandacht zich op cytologie, wat een minimaal invasieve methode is en daardoor ook minimale schade aanricht aan het oogoppervlak. Herpes simplex virus (HSV)-keratitis en infectieuze cornea-ulcera kunnen ook allebei het cornea-oppervlak ernstig beschadigen. We onderzochten (Deel III) de invloed van genetische verschillen in het lactoferrine en IL-10-gen bij patiënten met infectieuze corneaziekten en tussen deze patiënten en gezonde individuen.

LIMBUSSTAMCELDEFICIËNTIE (DEEL I)

Het accuraat volgen van limbustransplantaten in diermodellen is moeilijk omdat de afstoting van een transplantaat niet altijd klinisch zichtbaar is. Met Enhanced Green Fluorescent Protein (E-GFP) waren we in staat een diermodel te ontwikkelen waar we de limbustransplantaten accuraat in vivo mee konden volgen (hoofdstuk 2). Het in vivo volgen van de transplantaten creëerde een grote hoeveelheid data van het zelfde proefdier op verschillende momenten in de tijd. Naast transplantaatoverleving kan ook het groeipatroon van het transplantaat worden onderzocht. Een bijkomend voordeel van het E-GFP-model is de reductie van het aantal proefdieren dat nodig is doordat de transplantaten beter gevolgd kunnen worden.

Hoofdstuk 2 beschrijft ook de verlenging van transplantaatoverleving door subconjunctivale injecties met clodonaatliposomen. Zonder immunosuppressieve therapie overleefden allogene en syngene transplantaten niet langer dan 14 dagen. Dit illustreert de nadelige immunogene werking van dit E-GFP diermodel. In de toekomst kunnen andere en nieuwe behandel mogelijkheden in dit limbustransplantatiemodel worden getest. Het E-GFP dat is ingebouwd in het limbustransplantaat maakt het diermodel bruikbaar voor nieuwe afbeeldingsmogelijkheden met behulp van fluorescentie. De confocale fluorescentie- microscoop genereert veel meer data dan de normale fluorescentiemicroscopie. De laser van de confocale fluorescentiemicroscoop maakt het mogelijk om ook diepere weefsellagen te bekijken. Met behulp van een computerprogramma is het mogelijk om een driedimensionale afbeelding te creëren. Deze driedimensionale afbeeldingen geven nieuwe inzichten in de groei van bloedvaten, zoals te zien is in hoofdstuk 2. Wij vonden een aanzienlijk aantal E-GFP positieve bloedvaten aan de onderkant van het transplantaat, die per definitie door het transplantaat zelf moe-

ten zijn gevormd. Confocale microscopie kan mogelijk ook worden gebruikt in de kliniek bij patiënten met limbusstamceldeficiëntie, en mogelijk ook bij patiënten met limbustransplantaten.

Vandaag de dag zijn nieuwe, zeer dure technieken ontwikkeld om patiënten met limbusstamceldeficiëntie te behandelen. Het kweken van patiënt-eigen limbusstamcellen zal het traditionele limbustransplantaat, dat bestaat uit een deel conjunctiva en deel cornea, grotendeels vervangen. Deze nieuwe gekweekte limbusstamcellen kunnen op eenvoudige wijze geïncorporeerd worden in het E-GFP diermodel. Daarnaast kunnen immunofluorescentiekleuringen samen met het E-GFP nieuwe inzichten geven in de acceptatie en groei van het transplantaat. Ook de nieuwe theorie over limbusstamcelcrypten kunnen worden onderzocht met dit nieuwe diermodel.

GEPIGMENTEERDE CONJUNCTIVA LAESIES (DEEL II)

Het conjunctivamelanoom en PAM zijn berucht om hun recidieven. Patiënten worden daarom ook regelmatig onderzocht en gebiopteerd. Deze veelvuldige invasieve ingrepen kunnen schade geven aan het oog en aan de limbus in het bijzonder, aangezien veel van deze laesies bij de limbus gelegen zijn. Daarom hebben wij in hoofdstukken 4, 5 en 6 nieuwe minder invasieve methodes om conjunctivale melanomen te diagnosticeren onderzocht. De nationale studie naar conjunctivamelanomen (hoofdstuk 3) beschrijft de overleving, de risicofactoren voor overlijden, de lokale recidieven en de metastasen op afstand; deze zijn gelijklopend aan eerder gepubliceerde gegevens. De belangrijkste risicofactor voor overlijden zijn tumorlokalisatie en tumordikte; tumoren met een niet-epibulbaire lokalisatie en dikkere tumoren hebben een slechtere overleving. De niet-epibulbaire lokalisatie was ook een risicofactor voor lokale recidieven, wat kan worden verklaard door de moeilijkere toegankelijkheid van deze tumoren voor de chirurg. Hoofdstuk 3 laat ook zien dat lokale recidieven mogelijk kunnen worden verminderd als er naast de excisie ook lokaal brachytherapie met Iridium of Strontium wordt toegepast. In de laatste decennia zijn verscheidene primaire behandelingsmogelijkheden voor conjunctivamelanomen toegepast, echter betrouwbare gerandomiseerde studies ontbreken in verband met de lage incidentie van deze tumor. Groot-schalige internationale samenwerking is nodig om verschillende behandelingsmogelijkheden en de klinische uitkomsten daarvan te onderzoeken. Voor de clinicus is het belangrijk om bij patiënten met gepigmenteerde conjunctivalaesies de caruncula, fornix, en palpebrale conjunctiva uitvoerig te onderzoeken. Bij de minste verdenking op een conjunctivamelanoom zijn aanvullende onderzoeken zoals cytologie en histologie noodzakelijk.

Cytologie

In een vroeg stadium kan het moeilijk zijn een conjunctivamelanoom te onderscheiden van een conjunctivale naevus, net zoals de ontwikkeling van een conjunctivamelanoom uit een PAM laesie. Alhoewel histologie de gouden standaard is om een conjunctivamelanoom te diagnosticeren, laten wij in hoofdstuk 4 zien dat cytologie een alternatief kan zijn. In een conjunctivamelanoom rijzen atypische cellen naar het epitheliale oppervlak, waar ze toegankelijk zijn voor cytologische afname. De sensitiviteit, specificiteit en negatief voorspellende waarde (respectievelijk 85%, 78% en 93%) zijn acceptabel, echter de positief voorspellende

waarde is laag (59%), waardoor een aanzienlijk aantal valspositieve uitslagen ontstaat. Toekomstig onderzoek moet uitwijzen of herhaaldelijke cytologische uitstrijken de voorspellende waarden doen toenemen. Een groot voordeel van cytologie is het beperkte invasieve karakter van de techniek, waardoor in kortere tijd meerdere cytologische uitstrijken kunnen worden afgenomen. Een biopsie daarentegen kan niet eindeloos worden herhaald, het zorgt voor destructie van conjunctivawefsel, is minder aangenaam voor de patiënt en kost meer tijd en middelen dan cytologie. Cytologie is daardoor mogelijk meer kosteneffectief.

Een nadeel van exfoliatiecytologie is de mogelijke lage opbrengst van cellen waardoor de beoordeling wordt bemoeilijkt. De Biopore membraan is een apparaat dat wel in staat is grotere hoeveelheden cellen af te nemen van het oogoppervlak (impressiecytologie), echter de grote omvang van het apparaat bemoeilijkt afname in de fornix en bij de caruncula (hoofdstuk 5). Exfoliatiecytologie en Biopore impressiecytologie zorgen voor additionele data voor de oogarts, waarmee waarschijnlijk een betere beslissing genomen kan worden over de behandeling. Slechts een kleine minderheid van de grotere oncologische centra hebben cytologie voor oppervlakkige oogtumoren tot hun beschikking. Wij onderstrepen de uitspraak van Singh dat alle grotere oogheelkundige centra impressiecytologie (Biopore) en/of exfoliatiecytologie tot hun beschikking zouden moeten hebben. Een voorwaarde is tevens de aanwezigheid van een ervaren cyto-patholoog. In de toekomst kunnen nieuwere technieken zoals de confocale microscopie de clinicus mogelijk helpen te differentiëren tussen PAM, conjunctivanaevus, en conjunctivamelanoom. Betrouwbare data over de sensitiviteit en specificiteit ontbreken nog voor de confocale microscopie.

Differentiatie

Differentiatie van een conjunctivamelanoom van een benigne gepigmenteerde laesie door middel van histologie kan soms moeilijk zijn, zeker bij adolescente patiënten. Daarom kan een betrouwbare marker voor het conjunctivamelanoom hulp bieden. In hoofdstuk 6 is S100A1 als mogelijke kandidaat marker naar voren gekomen om een conjunctivamelanoom te onderscheiden van een naevus. Extra onderzoek is nodig om uit te vinden of S100A1 ook in staat is een Spitz naevus te onderscheiden van een conjunctivamelanoom. Dit kan van extra waarde zijn omdat deze twee gepigmenteerde laesies histologisch zeer op elkaar kunnen lijken. Tevens kunnen S100A1 en S100B mogelijke kandidaat-serummarkers zijn voor het vroeg ontdekken van conjunctivametastasen.

Cellijn

Al het voorgaande onderzoek is beperkt geweest door de lage incidentie van het conjunctivamelanoom. Cellijnen van een conjunctivamelanoom kunnen helpen om de kennis over de tumor te verbeteren. In hoofdstuk 7 wordt de vierde conjunctivamelanoom-celijn ter wereld beschreven. Het is een stabiele cellijn met een relatief hoge celdeling en een sterk verstoord karyogram, mogelijk veroorzaakt door de oorsprong van de cellijn uit een recidief-conjunctivamelanoom na excisie en lokale brachytherapie. Wanneer alle vier de conjunctivamelanoomcellijnen worden gecombineerd, kunnen nieuwe onderzoeksgebieden worden verkend, zoals genomics en proteomics. Ook kunnen diermodellen voor conjunctivamelanomen worden ontwikkeld met behulp van een cellijn.

CORNEA INFECTIES (DEEL III)

HSV (Herpes Simplex Virus)

Het recidiverende karakter van HSV-keratitis, in het bijzonder dat van de immuunstromale en stroomaal necrotische keratitis, zorgt voor een aanzienlijke schade aan het hoornvlies. Zij zijn daardoor ook verantwoordelijk voor een groot deel van de blindheid en slechtziendheid in de westerse wereld, ondanks de lage prevalentie (0.15%). Veel facetten van de herpes keratitis zijn niet goed begrepen, waaronder de lage prevalentie, terwijl de meeste individuen herpes virus in hun traanvocht blijken te hebben. Daarnaast ontbreekt een goede verklaring voor de grote spreiding in recidieffrequenties bij HSV-keratitispatiënten. Aangezien de meeste patiënten HSV in hun tranen hebben, zal een zeer effectief anti-HSV mechanisme in óf de traanfilm óf het oogoppervlak aanwezig moeten zijn om deze aandoening te voorkomen. Lactoferrine hebben wij onderzocht als een van de kandidaten die invloed kan hebben op het ontstaan en de ernst van HSV-keratitis. In diersmodellen is een duidelijke relatie gelegd tussen lactoferrine en HSV-keratitis, we hadden daarom een lagere lactoferrineconcentratie verwacht in de HSV- patiëntengroep. We hebben dit echter niet kunnen aantonen (hoofdstuk 8). Ook was er geen relatie met de ernst van de HSV-infectie. Een relatie tussen het ontstaan van HSV- keratitis en lactoferrinegen-polymorfisme op positie 561 is wel aangetoond. Allel Asp561 lijkt een beschermende factor te zijn. Polymorfisme Glu561Asp is niet geassocieerd met de ernst van een HSV-infectie. De verschillende structuur van het Asp561 lactoferrine kan mogelijk de oorzaak zijn voor het verschil in vatbaarheid voor het Herpes Simplex Virus. In de toekomst moeten in vivo- en in vitrostudies met recombinant Asp561 en Glu561 lactoferrine deze theorie bevestigen. Aangezien HSV-keratitis een complex proces is waarbij veel cytokines en chemokines betrokken zijn, is het waarschijnlijk dat andere eiwitten dan lactoferrine ook van invloed zijn op het ontstaan van HSV-keratitis. Interleukine(IL)-10, IL-12 en INF-gamma zijn voorbeelden van eiwitten die invloed kunnen uitoefenen op HSV infecties. Polymorfismen in deze genen kunnen kandidaat zijn voor toekomstig onderzoek. Niet alleen gastheerfactoren beïnvloeden HSV-infecties, verschillende HSV-stammen kunnen ook verantwoordelijk zijn voor verschillen in ernst van de keratitis. Op dit moment worden verschillende IL-10-gen polymorfismen onderzocht in de HSV-patiënten groep.

Cornea ulcus

In tegenstelling tot HSV-infecties worden de oorzaken van infectieuze cornea-ulcera beter begrepen. Trauma's door een corpus alienum of contactlenzen zorgen voor epitheliale defecten in het hoornvlies die als porte d'entrée dienen voor micro-organismen. Veel individuen ondervinden kleine trauma's aan het hoornvlies en een klein deel daarvan ontwikkelt een infectieus cornea ulcus. De hoeveelheid micro-organisme, virulentie van het organisme en het immuunsysteem spelen allemaal een rol in het ontstaan van een cornea-infectie. Vooral bij dragers van contactlenzen met een matige hygiëne is de hoeveelheid bacteriën groot, waardoor zij vatbaarder zijn voor infecties. Bovendien worden vaak virulente micro-organismen gekweekt uit de bewaarbakjes van de contactlenzen.

Lactoferrine gen polymorfisme

Lactoferrine, behorend tot het 'innate' immuunsysteem, beïnvloedt cornea-infecties door de antibacteriële en immuunmodulerende eigenschappen. De lactoferrine-polymorfismes die aan de orde zijn gekomen in hoofdstuk 8 hebben we ook onderzocht in hoofdstuk 9 bij patiënten met een infectieus cornea-ulcus. Tussen patiënten met een cornea-ulcus en gezonde proefpersonen zijn geen verschillen in frequentie van lactoferrine-polymorfismes gevonden. Dit in tegenstelling tot de HSV-keratitis-patiëntengroep. Waar bij HSV-keratitis het cornea-epitheel initieel intact is, is bij het cornea-ulcus waarschijnlijk eerst een epitheeldefect nodig voordat de infectie tot stand kan komen. Het is daardoor minder aannemelijk dat lactoferrine invloed heeft op het ontstaan van een infectieus cornea-ulcus, alhoewel lactoferrine wel mogelijk invloed heeft op de hoeveelheid bacteriën op het oogoppervlak. We hebben wel een trend gevonden voor een tragere epitheliale genezing in patiënten met een Glu561 lactoferrine allel. Dit geeft aan dat het Glu561Asp polymorfisme waarschijnlijk een functioneel effect heeft, zoals we ook al hebben gezien in hoofdstuk 8. In de toekomst kunnen verschillen in wondgenezing, anti-inflammatoire en antibacteriële effecten van de verschillende lactoferrines in vitro en in vivo worden onderzocht met behulp van recombinante lactoferrines.

IL-10 promotor gen polymorfismes

Zowel het infecterende micro-organisme als het immuunsysteem zijn verantwoordelijk voor schade aan het hoornvlies in infectieuze cornea-ulcera. IL-10 is een sterke suppressor van het immuunsysteem, en polymorfismes in de promotorregio van het IL-10 gen zorgen voor verschillen in IL-10 expressielevels in vitro. Daarom hebben wij onderzocht of IL-10 polymorfismes -C819T, -G1082A, -A2763C, en -A2849G invloed uitoefenen op infectieuze cornea ulcera (hoofdstuk 10). Het IL-10 -819C allel en -2849AA genotype bleken een beschermend effect te hebben op het ontstaan van een cornea-ulcus. Het -2849AA genotype is geassocieerd met lagere IL-10 waarden, waardoor het lokale immuunsysteem mogelijk beter in staat is geweest een cornea ulcus te voorkomen. We hebben in hoofdstuk 10 ook laten zien dat, wanneer er eenmaal een infectie tot stand is gekomen, het gunstiger is om een genotype te hebben dat geassocieerd is met hogere IL-10 waarden. Met andere woorden: patiënten met het 2763A allel of IL-10.1 haplotype – beide geassocieerd met lage IL-10 waarden – hebben een ernstiger klinisch beeld, wat wil zeggen grotere ulcera, langere duur van het epitheliaal defect en langere duur van de behandeling. Het omgekeerde was te zien voor haplotype IL-10.5 dat geassocieerd is met een hoge IL-10 productie. Of deze polymorfismes ook een invloed hebben op de lokale IL-10 productie bij het oog is niet bekend. In theorie kunnen hogere IL-10 waarden zorgen voor een demping van de inflammatie en daardoor voor minder schade aan het hoornvlies. In de toekomst moet worden uitgezocht of deze polymorfismes van invloed zijn op de lokale IL-10 productie en ook of IL-10 als lokaal adjuvante therapie de ernst van de infectie kan beperken. Naast de lactoferrine en IL-10 gen polymorfismes kunnen andere gen polymorfismes ook van invloed zijn op infectieuze cornea-ulcera. Mogelijk kunnen we in de toekomst een risicoprofiel ontwikkelen op basis van verschillende gen-polymorfismes.

